

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/01845 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Januar 2000 (13.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02094 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Juli 1999 (01.07.99) (30) Prioritätsdaten: 198 29 473.5 1. Juli 1998 (01.07.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: VON KNEBEL DOEBERITZ, Magnus [DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Sektion für Molekulare Diagnostik und Therapie, Im Neuenheimer Feld 110, D-69120 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<p>(54) Title: METHOD FOR EARLY DIAGNOSIS OF CARCINOMAS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FRÜHEN DIAGNOSE VON CARCINOMEN (57) Abstract The present invention relates to a method for early diagnosis of carcinomas and the precursors thereof, comprising determination of the over-expression of a cell cycle regulator protein in an organic sample. The invention also relates to a kit that can be used for said method. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen und ihren Vorstufen, das die Bestimmung der Überexpression eines Zellzyklus-Regulatorproteins in einer Körperprobe umfaßt. Ferner betrifft die Erfindung einen hierfür verwendbaren Kit.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen sowie ihren Vorstufen, insbesondere von Carcinomen des oberen Respirationstraktes oder des Anogenitaltraktes.

Seit Mitte der 50iger Jahre werden Vorsorgeprogramme für die verschiedensten Carcinome angeboten. Für das Cervix-Carcinom basieren diese hauptsächlich auf der morphologisch-cytologischen Untersuchung von Zellabstrichen der Cervix-Uteri, sog. Pap-Test, die in regelmäßigen Abständen bei der Frau ab dem 20. Lebensjahr im Rahmen von gynäkologischen Routineuntersuchungen entnommen werden. Anhand der Morphologie der Zellen werden die Abstriche in unterschiedliche Ausprägungsgrade dysplastischer Zellveränderungen eingeteilt. Die-se Ausprägungsgrade werden mit normal, milde Dysplasie, mittlere Dysplasie, schwere Dysplasie bzw. invasives Carcinom entsprechend Pap I-V bezeichnet. Bei einem auffälligen Ergebnis des Pap-Tests wird eine kleine Biopsie entnommen und einer histopathologischen Untersuchung unterworfen, durch welche die Art und Ausprägung der Dysplasie festgestellt und als cervikale intraepitheliale Neoplasie (CINI-III) eingestuft werden.

Trotz aller Vorsorgeprogramme ist das Cervix-Carcinom mit über 400000 Neuerkrankungen pro Jahr das zweithäufigste Carcinom der Frau. Dies liegt u.a. daran, daß die Ergebnisse des Pap-Tests bis zu 30 % falsch-negativ sind.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem das Cervix-Carcinom frühzeitig und zuverlässig diagnostiziert werden kann. Ferner sollten durch das Verfahren gutartige entzündliche oder metaplastische Veränderungen von dysplastischen Präneoplasien abgegrenzt werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfahrung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß Zellzyklus-Regulatorproteine in vielen Carcinomen, z.B. solchen des oberen Respirationstraktes oder Anogenital-Carcinomen, insbesondere Cervix-Carcinom, bzw. Vorstufen dieser Carcinome, überexprimiert sind. Beispiele der Zellzyklus-Regulatorproteine sind Zykline. Besonders sind Zyklin-abhängige Kinasen zu nennen, welche die Zykline regulieren. Ganz besonders sind Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren zu nennen, welche wiederum die Zyklin-abhängigen Kinasen regulieren. Beispiele der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren sind die Proteine p14, p15, p16, p19, p21 und p27. Der Anmelder hat gefunden, daß die Stärke der Überexpression der Zellzyklus-Regulatorproteine mit dem Grad der Zell-Dysplasie korreliert.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders für ein Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen und ihren Vorstufen genutzt, das die Bestimmung der Überexpression von Zellzyklus-Proteinen in einer Körperprobe umfaßt.

Der Ausdruck "Carcinome und ihre Vorstufen" umfaßt Carcinome jeglicher Art und Herkunft bzw. Vorstufen dieser. Beispielsweise können es Carcinome des oberen Respirationstraktes oder Anogenital-Carcinome, insbesondere das Cervix-Carcinom, sein. Von letzterem sind auch seine Vorstufen, z.B. cervikale intraepitheliale Neoplasie (CINI-III), Carcinoma in situ (CIS), etc. besonders zu nennen.

Der Ausdruck "Zellzyklus-Regulatorproteine" umfaßt Zellzyklus-Regulatorproteine jeglicher Art und Herkunft. Beispielsweise können es Zykline sein. Besonders können es Zyklin-abhängige Kinasen sein, welche die Zykline regulieren. Beispiele der Zyklin-abhängigen Kinasen sind die Proteine cdk4 und cdk6. Ganz besonders können es Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren sein, welche wiederum die Zyklin-abhängigen Kinasen

regulieren. Beispiele der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren sind die Proteine p14, p15, p16, p18, p19, p21 und p27, wobei p16 bevorzugt ist.

Der Ausdruck "Körperprobe" umfaßt jegliche Körperproben, in denen Zellzyklus-Regulatorproteine nachgewiesen werden können. Beispiele solcher Körperproben sind Blut, Abstriche, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, gastrointestinale Sekrete, Lymphflüssigkeit, Knochenmark, Organpunktate und Biopsien. Insbesondere sind Abstriche und Biopsien angesagt, wenn es sich um den Nachweis von Anogenital-Carcinomen, z. B. Cervix-Carcinom, handelt.

Der Ausdruck "Bestimmung der Überexpression von Zellzyklus-Regulatorproteinen" umfaßt jegliche Verfahren, die sich zum Nachweis der Expression von Zellzyklus-Regulatorproteinen oder ihrer kodierenden mRNAs bzw. einer Amplifikation der entsprechenden Gene eignen. Zur Feststellung einer Überexpression bietet es sich dann an, die zu untersuchende Körperprobe mit einer entsprechenden Körperprobe zu vergleichen, die aus gesunden Personen stammt. Eine solche kann in standardisierter Form vorliegen. Der Nachweis der (Über)Expression von Zellzyklus-Regulationsproteinen kann auf Nukleinsäure- bzw. Protein-Ebene erfolgen. Für den Nachweis auf Protein-Ebene können z.B. Antikörper verwendet werden, die gegen Zellzyklus-Regulatorproteine gerichtet sind. Diese Antikörper können in den verschiedensten Verfahren wie, Western-Blot, ELISA oder Immunpräzipitation eingesetzt werden. Günstig kann es sein, wenn die Antikörper auf festen Trägern, wie Teststreifen oder Latex-Partikel, fixiert sind.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Carcinome frühzeitig, d.h. in ihren Vorstufen, zu diagnostizieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Durchführung eines erfindungsgemäßem Verfahrens. Ein solcher Kit umfaßt:

- (a) ein Reagenz zum Nachweis der Expression eines Zellzyklus-Regulatorproteins, z.B. einen gegen ein solches gerichteten Antikörper oder eine für ein solches kodierende Nukleinsäure bzw. Teile davon,
- (b) übliche Hilfsmittel, wie Puffer, Träger, Marker, etc., und ggfs.
- (c) ein Mittel für Kontrollreaktionen, z.B. ein Zellzyklus-Regulatorprotein, eine für ein solches kodierende Nukleinsäure bzw. Teile davon, oder eine Zellpräparation z.B. einen Gewebeschnitt oder auf einem Objektkörper fixierte Zellen.

Für die einzelnen Komponenten des Kits gelten vorstehende Ausführungen entsprechend. Ferner können von den einzelnen Komponenten ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Carcinome frühzeitig zu diagnostizieren. Insbesondere können Vorstufen von Carcinomen frühzeitig erkannt werden. Zu betonen ist auch, daß gutartige entzündliche oder metaplastische Veränderungen von dysplastischen Präneoplasien abgegrenzt werden können. Kennzeichnend ist ferner, daß die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erzielten Ergebnisse nicht einer subjektiven Bewertung unterliegen, wodurch z.B. die falsch-negativen bzw. falsch-positiven Ergebnisse eines Pap-Tests oder von histologischen Präparationen vermieden werden können. Des Weiteren zeichnet sich die vorliegende Erfindung durch schnelle und einfache Handhabung aus, wodurch sie für große Screening-Maßnahmen, insbesondere auch in Ländern der Dritten Welt, geeignet ist. Somit stellt die vorliegende Erfindung einen wichtigen Beitrag zur modernen Diagnostik von Krebserkrankungen dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnung.

Fig. 1 zeigt den Nachweis der Überexpression von cdk4 in HPV16-transformierten cervicalen Carcinoma-Zellen CaSki. Die Angaben 4 h, 8 h, 12 h, 24 h weisen auf

die Zeitpunkte der Entnahme der Zellextrakte hin.
Die Angabe co bedeutet Kontrolle während arr die
Zugabe des Serums andeutet.

Fig. 2 zeigt den Nachweis der Überexpression von cdk6 und p19 in HPV16-transformierten NIH3T3-Zellen. Die Angabe co bedeutet Kontrolle.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis der Überexpression von p16 in Biopsien der Cervix Uteri

(A) Aus 20 Biopsien der Cervix Uteri, die alle Grade der dysplastischen Progression von Normalgewebe (n=2) über CIN I (n=4), II (n=4), III (n=5) Läsionen bis hin zum invasiven Carcinom (n=5) umfassen, werden Paraffin-Schnitte mit einer Dicke von 3-5 μ m hergestellt. Diese werden 2 x 10 min in Xylol entparaffiniert und mit Ethanol rehydriert. Die Demaskierung der Antigene erfolgt in 10 mM Citrat-Puffer (pH 6,0) im Autoklaven bei 110°C für 10 min. Anschließend werden die endogenen Peroxidasen mit 0,25 % H₂O₂ in PBS inaktiviert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungstellen mit Pferde-Serum (Vectastain ABC detection kit, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) für 20 min bei Raumtemperatur, werden die Schnitte für 45 min bei Raumtemperatur mit einem p16-spezifischen, monoklonalen Antikörper (Neomarkers, Fremont, Kalifornien, USA) in Anwesenheit von 3 % fötalem Kälberserum inkubiert. Zum Nachweis der p16-Antikörper-Bindung wird dann ein biotinylierter Sekundär-Antikörper (Pferd-Anti-Maus-IgG, Vectastain kit, vgl. vorstehend) für 30 min hinzugegeben. Anschließend erfolgt der Nachweis des gebundenen Sekundär-Antikörpers mit den Reagenzien und nach Anweisung des Vectastain kits und eine Kern-Gegenfärbung mit Meyerscher Hämalaunlösung.

Es zeigt sich, daß in Zellen mit Dysplasien eine Überexpression von p16 vorliegt. Ferner zeigt sich, daß die Stärke der Überexpression von p16 mit dem Grad der Zell-Dysplasie korreliert.

(B) Ferner werden aus 78 Biopsien der Cervix Uteri Paraffin-Schnitte hergestellt. Die Biopsien betreffen Normalgewebe ($n = 12$), dysplastische Läsionen der Stufen CIN I ($n = 15$), II ($n = 14$) und III ($n = 18$) sowie invasive Carcinome ($n = 19$). Die Paraffin-Schnitte werden, wie in (A) beschrieben, behandelt. Es werden die in Tabelle 1 angegebenen Daten erhalten.

Tabelle 1

p16 Expressionsstärke

Histologie	n=	-	+	++	+++
normal	12	9	3		
CIN I	15	10	3	2	
CIN II	14	1	4	9	
CIN III	18			9	9
CxCa	19			1	18
insgesamt	78	20	10	21	27

Aus den Daten von Tabelle 1 geht hervor, daß p16 in Zellen von Dysplasien und invasiven Carcinomen überexprimiert wird, wobei die Überexpression mit dem Grad der Dysplasie hin zum invasiven Carcinom zunimmt.

(C) Desweiteren werden Paraffin-Schnitte von 180 Biopsien der Cervix Uteri, wie in (A) beschrieben, behandelt. Ferner

wird die prozentuale Zellzahl bestimmt, die mit dem vorstehenden p16-spezifischen monoklonalen Antikörper reagiert. Desweiteren wird zwischen HPV positiven und HPV negativen Dysplasien bzw. invasiven Carcinomen unterschieden. Es werden die in Tabelle 2 angegebenen Daten erhalten.

Tabelle 2
Prozentsatz von Zellen, die p16 überexprimieren

	n	gemittelter Prozentsatz \pm Standardabweichung
CIN I	32	54.9 \pm 24.0
HPV negativ	17	54.0 \pm 27.2
HPV positiv	15	55.9 \pm 21.0
CIN II	32	70.8 \pm 18.9
HPV negativ	14	76.0 \pm 15.8
HPV positiv	18	66.8 \pm 20.5
CIN III	60	92.4 \pm 10.2
HPV negativ	9	94.4 \pm 7.5
HPV positiv	51	92.1 \pm 10.7
Invasives Carcinom	58	97.8 \pm 5.2
HPV negativ	5	96.4 \pm 8.1
HPV positiv	53	97.9 \pm 4.9

Aus den Daten der Tabelle 2 geht hervor, daß p16 sowohl in HPV positiven als auch HPV negativen Zellen von Dysplasien und invasiven Carcinomen überexprimiert wird. Kontrollen mit Normalgewebe bestätigen dies. Ferner zeigen die Daten, daß der Prozentsatz an Zellen, die mit p16 reagieren, mit dem Grad der Dysplasie hin zum invasiven Carcinom zunimmt.

Beispiel 2: Nachweis der Überexpression von Zellzyklus-Regulatorproteinen in HPV-transformierten zellen

(A) Cervicale Carcinoma-Zellen CaSki, die mit HPV16 transformiert sind, werden in Abwesenheit von Serum 72 h kultiviert. Nach Zugabe von Serum werden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellextrakte gewonnen, einer SDS-PAGE unterworfen und auf PVDF-Membranen (Du Pont) transferiert. Die Expression von cdk4 wird mit polyklonalem Antiserum (1 : 1000) von Santa Cruz bestimmt. Ferner wird die Expression von HPV16 - E7 Protein mit einem monoklonalen Antikörper gegen HPV16 E7 (1 : 50) von Triton bestimmt. Der Nachweis der einzelnen Immunreaktionen erfolgt über Peroxidase-gekoppelte Zweit-Antikörper und ein Chemilumineszenz-Nachweissystem (NEN, Du Pont).

Es zeigt sich, daß cdk4 überexprimiert wird (vgl. Fig. 1).

(B) NIH3T3-Zellen werden mit HPV16 transformiert, wodurch eine Expression von HPV16-E7 Protein erhalten wird. Zellextrakte der transformierten Zellen werden, wie in (A) beschrieben, gewonnen und behandelt. Zum Nachweis der Expression von cdk6 bzw. p19 werden polyklonale Antiseren (1 : 1000) von Santa Cruz eingesetzt. Hinsichtlich des Nachweises der Expression von HPV16-E7 Protein und des Nachweises der einzelnen Immunreaktionen wird auf vorstehende Ausführungen unter (A) verwiesen.

Es zeigt sich, daß cdk6 und P19 überexprimiert werden (vgl. Fig. 2).

K 2696

Patentansprüche

1. Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen und ihren Vorstufen, umfassend die Bestimmung der Überexpression eines Zellzyklus-Regulatorproteins in einer Körperprobe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Carcinome solche des oberen Respirationstraktes sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Carcinome Anogenital-Carcinome sind.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Anogenital-Carcinom ein Cervix-Carcinom ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein eine Zyklin-abhängige Kinase ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zyklin-abhängige Kinase cdk4 oder cdk6 ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4 , wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor ein Protein p14, p15, p16, p18, p19, p21 oder p27 ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 9, wobei die Körperprobe Blut, Abstriche, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Galle, Knochenmark, gastrointestinale Sekrete, Organpunkte bzw. Biopsin und/oder Lympheflüssigkeit umfaßt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10, wobei die Bestimmung der Überexpression auf dem Nukleinsäure-Level erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10, wobei die Bestimmung der Überexpression auf dem Protein-Level erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Bestimmung durch einen gegen ein Zellzyklus-Regulatorprotein gerichteten Antikörper erfolgt.
14. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 13, umfassend:
 - (a) ein Reagenz zum Nachweis der Expression eines Zellzyklus-Regulatorproteins,
 - (b) übliche Hilfsmittel, wie Puffer, Träger, Marker, etc. und ggfs.
 - (c) ein Mittel für Kontrollreaktionen.
15. Kit nach Anspruch 14, wobei das Reagenz ein gegen ein Zellzyklus-Regulatorprotein gerichteter Antikörper ist.
16. Kit nach Anspruch 14, wobei das Reagenz eine für ein Zellzyklus-Regulatorprotein kodierende Nukleinsäure oder Teile davon ist.
17. Kit nach einem der Ansprüche 14-16, wobei das Mittel ein Zellzyklus-Regulatorprotein oder eine für ein solches kodierende Nukleinsäure oder Teile davon ist.
18. Kit nach einem der Ansprüche 14-16, wobei das Mittel eine Zellpräparation ist.

1/2

NIH3T3

CO E7

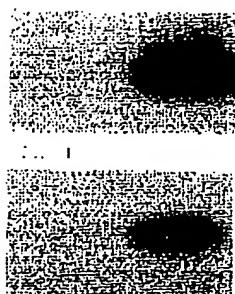


Fig. 1

2/2

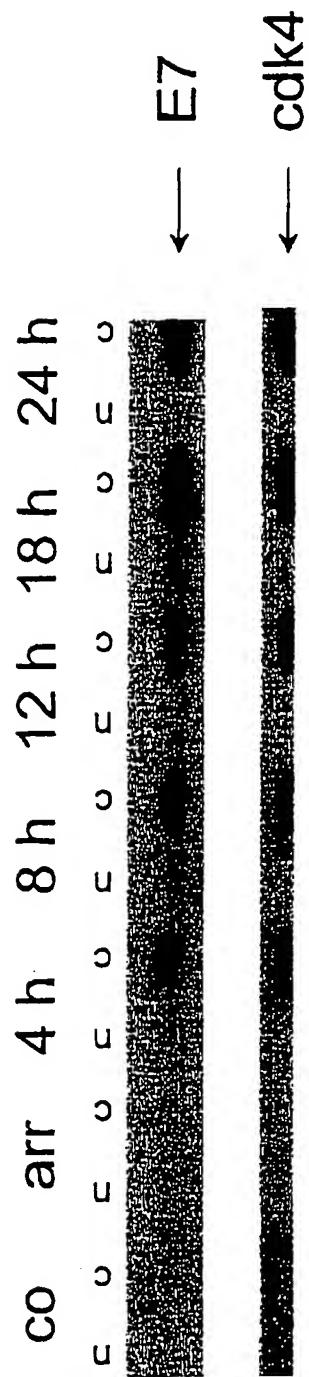


Fig. 2